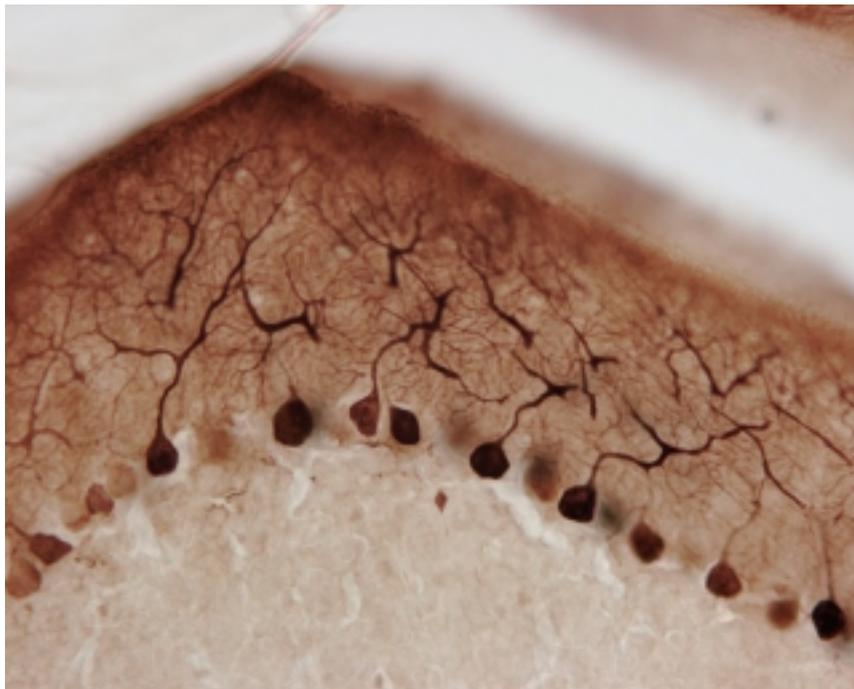


ENCUENTROS EN LA BIOLOGÍA



Editor:

Salvador Guirado

Comité editorial:

Ramón Muñoz-Chápuli,
Antonio de Vicente,
José Carlos Dávila,
Francisco Cánovas,
Francisca Sánchez

Editado con la financiación del
Vicerrectorado de Investigación y
Desarrollo Tecnológico de la
Universidad de Málaga.

El Centro de Profesorado de Málaga
colabora en la distribución de esta
publicación.

Diseño de la portada:

Salvador Guirado

Correspondencia a:

Encuentros en la Biología,
Salvador Guirado (Editor),
Depto. Biología Celular,
Facultad de Ciencias,
Campus de Teatinos,
29071 Málaga
Tfno.: 952 131961
email: guirado@uma.es

Dirección Internet:

[http://www.uma.es/publicaciones/
encuentros](http://www.uma.es/publicaciones/encuentros)

D.L.:MA-1.133/94

3 En las redes de la regulación bacteriana

Raquel Doña Díaz es estudiante de Doctorado en el departamento de Microbiología de la UMA.

4 Acupuntura y sistemas moduladores del dolor

José Carlos Dávila es Profesor Titular de Biología Celular en la UMA.

6 Señales Wnt para la inducción de la cresta neural

Ramón Muñoz-Chápuli es Catedrático de Biología Animal en la UMA.

EN LAS REDES DE LA REGULACIÓN BACTERIANA

Raquel Doña Díaz

El estudio de las bases moleculares de la vida se ha visto impulsado en los últimos años por el avance de las nuevas técnicas (genómica y proteómica), así como por el empleo de diferentes modelos de estudio, destacando siempre el uso de microorganismos. Dentro de todos estos estudios, se está prestando especial atención al conocimiento de las distintas reacciones que forman la red que regula el comportamiento de un determinado organismo, ya que una vez se conocen ciertas características (por ejemplo, la producción de antibióticos por parte de una bacteria) resulta de interés conocer en qué condiciones se produce para optimizar la obtención de este compuesto.

En cuanto al estudio de microorganismos, en los últimos años ha aumentado el interés por el control biológico de enfermedades en plantas, el cual implica el uso de microorganismos beneficiosos como hongos o bacterias para controlar una gran variedad de patógenos vegetales. Actualmente, se conocen cuatro mecanismos generales de control biológico: competición por los nichos y nutrientes (colonización microbiana de la rizosfera), predación (producción de enzimas líticas que permiten atacar a patógenos), antibiosis (producción de metabolitos secundarios, como compuestos volátiles, sideróforos, antibióticos, etc.) y la inducción de las defensas de la planta (resistencia sistémica inducida o ISR). Así, los estudios actuales usan este modelo de estudio para conocer la intrincada red de regulación y, como modelo de estudio, se está profundizando en la producción de antibióticos.

Se ha demostrado que el principal mecanismo de regulación de la producción de antibióticos está mediada por «quorum sensing» (QS). El QS es un mecanismo de comunicación entre las bacterias que permite detectar el número de células de su propia población gracias a la percepción de unas moléculas señales (autoinductores) y, así, regular la expresión de un conjunto de genes especializados en respuesta a la densidad de sus poblaciones (ver *Encuentros en la Biología* n° 63 y 68). En general, las bacterias Gram-negativas usan N-acil-homoserina lactonas (AHLs) como autoinductores, y las bacterias Gram-positivas utilizan oligopéptidos para comunicarse, y aunque la naturaleza de las señales químicas, los mecanismos de transmisión de señales, y los genes dianas controlados por sistemas de QS difieren, en cada caso la capacidad para

comunicarse con otros permite a la bacteria coordinar la expresión de sus genes, su fisiología y también el comportamiento de toda la comunidad (Miller y Bassler, 2001. *Ann. Rev. Microbiol.*, **55**: 165-199). Bajo ciertas circunstancias, la actuación colectiva de las bacterias es más eficiente que si las bacterias actuaran individualmente, como por ejemplo, a la hora de atacar a otros organismos, producir una elevada concentración de metabolitos, o para la supervivencia mediante la generación de distintos tipos celulares con diferentes capacidades para adaptarse a los cambios ambientales (Shapiro, 1998. *Ann. Rev. Microbiol.*, **52**: 81-104).

En el sistema de QS, se encuentran implicadas dos proteínas pertenecientes a la familia de reguladores de respuesta. Una primera proteína codifica una sintasa, que produce la molécula señal o autoinductor cuando es activada por distintos estímulos ambientales que, generalmente, suelen ocasionar estrés bacteriano. Cuando la población bacteriana aumenta, el nivel de autoinductor se incrementa, y como es una molécula pequeña puede incorporarse de nuevo al interior celular y forma un complejo con una segunda proteína, un regulador transcripcional, y activa la transcripción de los genes encargados de producir bioluminiscencia, exoenzimas, o antibióticos, como en el caso de *Pseudomonas*.

En la producción de antibióticos de la familia de las fenacinas, otros sistemas de regulación, que actúan a un nivel más general, son los determinados sistemas globales de regulación que también intervienen en la producción de metabolitos secundarios. En algunas cepas de *Pseudomonas fluorescens*, la expresión de antibióticos como 2,4-diacetil-floroglucinol, pioluteorina y pirrolnitrina, está regulada por el sistema global de regulación *gacS* y *gacA*. Estos sistemas de regulación global funcionan mediante diferentes estímulos ambientales, que son recogidos por la proteína de membrana GacS, que a su vez estimula a GacA, que es una proteína quinasa que interviene en múltiples procesos, y que incluye entre sus acciones la propia regulación de los sistemas de QS (Ching-A-Woeng et al. 2000. *MPMI* **13**: 1340-1345).

Una tercera vía de regulación son los llamados sistemas globales de respuesta a estrés, que también intervienen en la regulación de los sistemas QS. Generalmente, determinados genes recogen las señales que indican una situación de estrés bacteriano (presencia de sustancias fruto de su

actividad metabólica, estímulos climáticos, etc.) y comienzan la inducción de la transcripción de algunos genes que a su vez regulan otros dando lugar a una cascada de inducción génica, para producir una proteína (una AHL-sintasa en este caso, o productora de autoinductores) que será la que actúe sobre el sistema QS, induciendo la síntesis de antibióticos.

Finalmente, existe otro sistema de regulación de la producción de metabolitos secundarios, el factor RpoS, el cual está implicado en la regulación de la expresión de unos 30 genes que funcionan durante o en la transición de la fase estacionaria. Se ha demostrado que RpoS afecta a la producción de pioluteorina y 2,4-diacetilfloroglucinol y a la actividad de control biológico en *P. fluorescens*. Existen evidencias de que *rpoS* está regulado directamente tanto por el sistema de QS como por

los componentes reguladores *gacS/gacA*.

El descubrimiento de nuevos antibióticos producidos por bacterias que puedan aplicarse como agentes de biocontrol es constante, y comprender cómo se regula la expresión de estos productos es esencial para el desarrollo de una agricultura ecológica, cada vez más demandada, evitando así la utilización de sustancias químicas para controlar enfermedades de las plantas que puedan ser perjudiciales para los seres vivos y el ambiente. Sin embargo, desenmarañar la red de los procesos, hasta ahora conocidos, que están implicados en la regulación de la producción de antibióticos es un proceso arduo que está siendo llevado a cabo por los investigadores y que, con la presencia de herramientas como la genómica funcional, terminarán por ser desentrañados, aunque la red...cada vez es más compleja.

ACUPUNTURA Y SISTEMAS MODULADORES DEL DOLOR

José Carlos Dávila

La acupuntura es una técnica terapéutica usada ampliamente para aliviar ciertos síntomas asociados con muchas enfermedades, y que consiste en la inserción de delgadas agujas en la piel en determinados puntos anatómicos del cuerpo denominados '**puntos de acupuntura**' (el nombre de acupuntura deriva de las palabras latinas *acus*, aguja, y *pungue*, penetrar). La acupuntura es una de las prácticas médicas más antiguas que se conoce, cuyo origen se remonta a unos 5.000 años. Se cree que la acupuntura se originó en China, desde donde se extendió hasta Occidente.

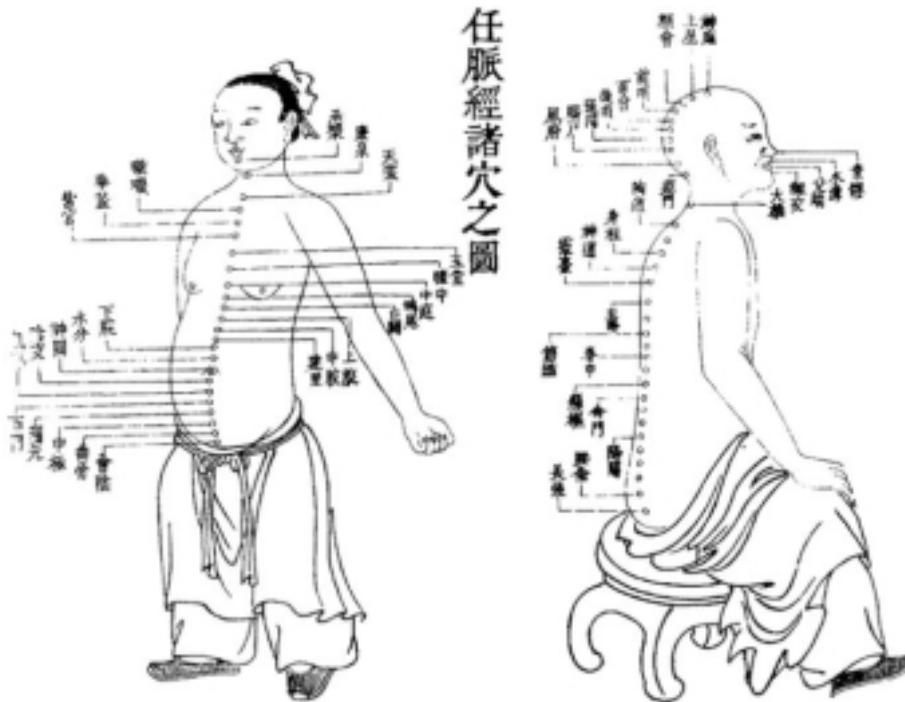
De acuerdo con las teorías de la medicina tradicional china, el cuerpo humano tiene más de 2.000 puntos de acupuntura, clasificados en 14 grupos separados. A la línea imaginaria que conecta los puntos de cada grupo se denomina '**meridiano**'. Hay, por tanto, 14 meridianos, 12 de los cuales se encuentran a ambos lados del cuerpo (son bilaterales) mientras que los dos restantes se encuentran en la línea media (uno delante y otro detrás, figura 1). Según la medicina tradicional china, estos meridianos conectan los puntos de acupuntura de la superficie del cuerpo con los órganos internos, formando unas vías o canales a través de las cuales fluye la energía vital (denominada '**Qi**') por todo el cuerpo. Un desequilibrio en el flujo del Qi puede ser la causa de las enfermedades, las cuales pueden ser tratadas introduciendo las agujas en esos canales, a través de los puntos de acupuntura, y así corregir los

desequilibrios.

Esto es aproximadamente en qué consiste la acupuntura según la medicina tradicional china. Creamos o no en el Qi, lo cierto es que numerosos estudios han documentado los efectos beneficiosos de la acupuntura, especialmente en el alivio del dolor, aunque en ningún caso se haya explicado de forma completamente satisfactoria cómo funciona la acupuntura en el contexto de la medicina occidental, o lo que es lo mismo, cuáles son las bases anatómicas de esta técnica milenaria.

Muy recientemente ha sido publicada en la prestigiosa revista *Trends in Neurosciences* una revisión sobre los efectos de la acupuntura en los sistemas endógenos de control del dolor, donde se pone de manifiesto la relación que existe entre esta práctica terapéutica (y en general la estimulación eléctrica periférica) y la analgesia mediada por opioides internos (Ji-Sheng Han, TINS, 26: 17-22; 2003).

Como es bien sabido, la percepción del dolor se origina normalmente por la estimulación de terminaciones nerviosas desnudas, que actúan de nociceptores, localizados en la piel y tejidos profundos. A partir de aquí, las señales nociceptivas son conducidas al sistema nervioso central a través de delgadas fibras nerviosas (axones mielínicos finos - fibras Ad- y amielínicos - fibras C) que establecen sinapsis con neuronas localizadas en el asta dorsal de la médula espinal. Las conexiones de las fibras nociceptivas sobre las células de la



médula espinal son complejas e incluyen sinapsis tanto sobre interneuronas como sobre neuronas de proyección. Estas últimas son las encargadas de transmitir las señales nociceptivas hacia otros centros del sistema nervioso como la formación reticular, el tálamo o la corteza cerebral. Se piensa que la llegada de las señales nociceptivas hacia el tálamo y la corteza forman la base de nuestras experiencias sensoriales sobre el dolor (percepción del dolor). Puesto que las neuronas del asta dorsal de la médula espinal constituyen el primer relevo de la vía sensorial, se puede considerar a esta región de la médula como la puerta de entrada al dolor.

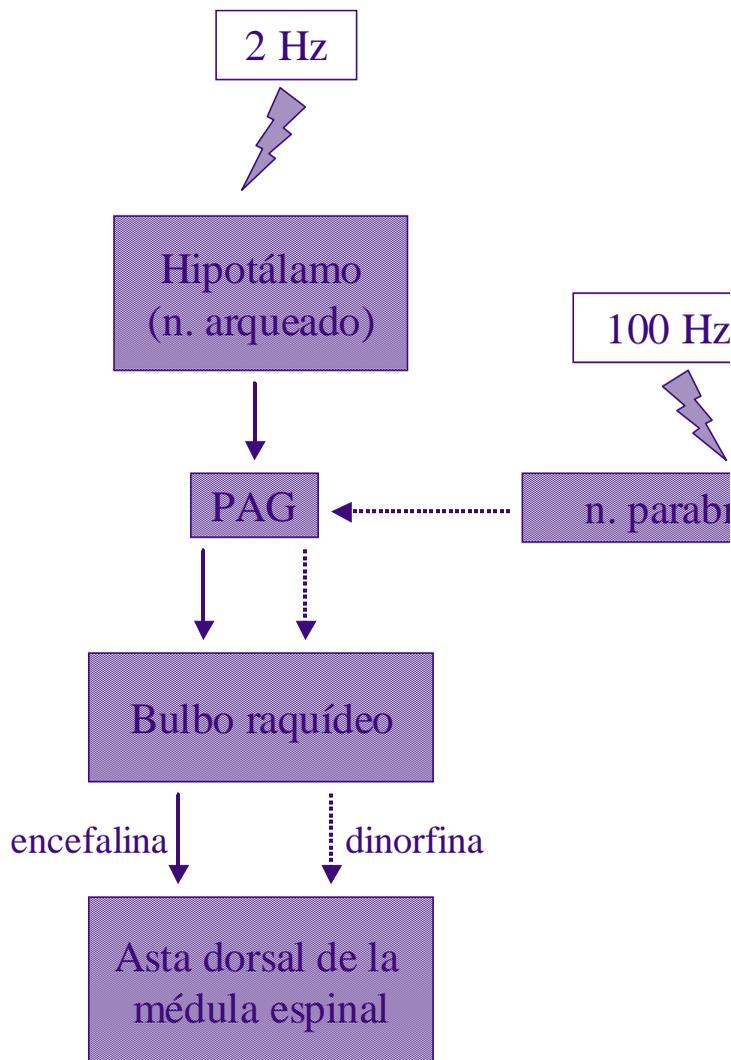
Se sabe desde hace tiempo que existen sistemas descendentes moduladores que, en determinadas situaciones como estrés, alerta o daño severo, actúan disminuyendo o incluso inhibiendo la percepción del dolor. Uno de estos sistemas estaría constituido por una serie de regiones encefálicas conectadas entre sí y finalmente con las neuronas del asta dorsal de la médula espinal sobre las cuales realizarían sus influencias inhibitorias. Una de estas áreas se localiza en el mesencéfalo formando una especie de anillo de sustancia gris alrededor del acueducto de Silvio, por lo que a esta región se le conoce como sustancia gris periacueductal, o mejor aún por sus siglas: PAG (del inglés **p**eriaqueductal **g**rey matter). Esta región del encéfalo tiene conexiones con el hipotálamo y también con núcleos del bulbo raquídeo, desde donde se originan eferencias hacia la médula espinal. Las investigaciones realizadas en

animales de experimentación muestran que la estimulación de PAG produce una analgesia profunda y selectiva, que puede ser explicada por la inhibición de las neuronas que transmiten las señales nociceptivas de la médula espinal.

Además de estas regiones del encéfalo, una clase de moléculas neurotransmisoras endógenas, los denominados péptidos opioides, parecen jugar un papel clave en la modulación del dolor. Ha sido demostrado que ciertas condiciones fisiológicas y patológicas pueden inducir la liberación de estos opioides y se conocen numerosos ejemplos

en los cuales estímulos dolorosos graves provocan la liberación de estas moléculas. Estos neuropéptidos endógenos ejercerían su acción analgésica actuando sobre receptores localizados en la membrana de ciertas neuronas. Tanto en la médula espinal como en PAG existen numerosos receptores de opioides.

Estudios recientes han demostrado que tanto la acupuntura como la electroacupuntura (una variante de la acupuntura manual en la cual se aplica estimulación eléctrica a través de finos electrodos insertos en la piel) producen sus efectos analgésicos induciendo la liberación de neuropéptidos específicos en el sistema nervioso central. Ambas técnicas parecen actuar mediante mecanismos neurofisiológicos muy parecidos, si no idénticos, aunque la electroacupuntura permite caracterizar ciertos parámetros (como por ejemplo la frecuencia de la estimulación) con mayor precisión. De esta forma, se ha podido demostrar que la estimulación eléctrica con distintas frecuencias provoca la liberación selectiva de diferentes péptidos opioides (como la encefalina y la dinorfina). Mientras que la estimulación periférica de baja frecuencia (2 Hz) producía un aumento significativo de encefalina (pero no de dinorfina) en la médula espinal, una estimulación de alta frecuencia (100 Hz) provocaba un aumento de dinorfina, sin afectar a la encefalina. Además, los efectos analgésicos inducidos por la estimulación de baja y alta frecuencia eran revertidos mediante la administración de antagonistas de receptores de opioides (que bloqueaban, por tanto, a dichos



receptores), lo que venía a demostrar que el efecto analgésico estaba mediado por dichos opioides.

Se ha sugerido que en la analgesia inducida por la electroacupuntura de baja o de alta frecuencia están implicadas diferentes regiones del encéfalo. Ciertos núcleos hipotalámicos (como el núcleo arqueado) parecen estar involucrados en el caso de la estimulación con frecuencias bajas, mientras

que el núcleo parabraquial del tronco juega un papel importante en el caso de la estimulación con frecuencias altas.

La figura 2 muestra un esquema simplificado de las posibles vías nerviosas (y neuropéptidos) que median la analgesia inducida por la electroacupuntura de baja y alta frecuencia. Los impulsos aferentes inducidos por la acupuntura serían transmitidos desde la superficie del cuerpo a través de fibras mielínicas (del tipo Ab y Ad; no mostrado en el esquema) hacia el hipotálamo o el núcleo parabraquial, según la frecuencia de la estimulación. Ambas regiones conectarían con PAG, que ocupa un lugar central y es común para ambos sistemas descendentes. El incremento en la liberación de encefalina o dinorfina a nivel del asta dorsal de la médula espinal provocaría la inhibición de las neuronas de proyección de la médula, disminuyendo de esta forma la percepción del dolor.

A pesar de que existen todavía ciertos aspectos de la acupuntura que son difíciles de

encajar en nuestros esquemas tradicionales, las investigaciones sobre los mecanismos moduladores del dolor parecen demostrar que es posible facilitar la liberación de ciertos neuropéptidos en el sistema nervioso central mediante la estimulación eléctrica periférica, activando de esta forma los mecanismos de control del organismo.

SEÑALES WNT PARA LA INDUCCIÓN DE LA CRESTA NEURAL

Ramón Muñoz-Chápuli

Uno de los rasgos más característicos de los vertebrados, más incluso que las vértebras que dan nombre al grupo, es la cresta neural. Se ha llegado a decir, con cierta exageración, que la cresta neural es lo único realmente interesante que tienen los vertebrados. También se la ha llamado la «cuarta hoja blastodérmica», colocándola en pie

de igualdad con ectodermo, mesodermo y endodermo. La verdad es que este conjunto de células embrionarias resulta fascinante por su origen, en la zona límite entre el ectodermo y la placa neural, por su capacidad migradora, que las hace extenderse rápidamente por todo el cuerpo, y sobre todo por su pluripotencialidad. Las células de

la cresta neural no sólo se diferencian en las neuronas del sistema nervioso periférico (simpático y parasimpático) y en las de los ganglios sensoriales de la raíz dorsal, sino que también dan lugar a la glía correspondiente, a los cromatóforos (los melanocitos de la piel en nuestro caso), a buena parte del tejido conectivo y del esqueleto facial, incluyendo las papilas dentarias, al esqueleto visceral (branquial), a la musculatura lisa de algunos grandes vasos como la aorta, al septo aorticopulmonar que divide el tracto de salida cardiaco, y a células endocrinas como las de la médula adrenal o las células C del tiroides, productoras de calcitonina. Desde el punto de vista de los derivados a los que da lugar, la cresta neural desempeña por tanto un papel intermedio entre el neuroectodermo (neuronas, glía) y el mesodermo (esqueleto, musculatura). En cualquier caso la cresta neural es un sistema excelente para estudiar procesos celulares fundamentales, como son los de la transición epitelio-mesénquima, la adquisición de propiedades migratorias, la diferenciación en respuesta a señales del entorno y la formación de patrones.

Se conocen relativamente poco los mecanismos que inducen la cresta neural a partir de sus precursores localizados en los márgenes de la placa neural. Recordemos que la placa neural es la zona más dorsal del ectodermo del embrión temprano de vertebrados. Por diversos mecanismos esta placa se curva y se hunde dentro del cuerpo del embrión, dando lugar al tubo neural. En algún momento de este proceso, dependiendo del grupo de vertebrados, las células del margen de la placa pierden su carácter epitelial, adquieren motilidad y migran por dos vías principales, una superficial, entre los somitos y la epidermis, y otra en profundidad. Pero como decíamos, se sabe o se sabía relativamente poco sobre las señales implicadas en el inicio del proceso. Sí se conocía que la participación del ectodermo era fundamental. Una placa neural aislada en un medio de cultivo no produce células de la cresta neural, salvo si se cocultiva con ectodermo. También se sabía que la inducción neural en el ectodermo requiere la inhibición de la vía de señalización por BMPs (*Bone Morphogenetic Proteins*, factores de crecimiento de la superfamilia TGF β). De esta forma antagonistas de BMP como Noggin inducen neuralización del ectodermo. En el embrión de pollo se había mostrado un mecanismo similar de represión de la vía BMP por FGFs (*Fibroblast Growth Factors*) y por Wnts, una familia de glucoproteínas muy importantes en la generación de patrones espaciales, como luego veremos.

Una vez comprobado que las señales de la vía

BMP deben ser reprimidas para la inducción del tejido neural, se planteaba la cuestión de si una represión parcial, en los bordes de la placa, podría inducir la cresta neural. Sin embargo se comprobó que, al menos en embriones de ave y en ensayos *in vitro*, esto no era posible. La inducción de la cresta neural en estos ensayos muestra dos fases, una en la que participa una señal de tipo BMP y otra que puede ser iniciada por FGFs, ácido retinoico o Wnts. También se sabía que es en esta fase en la que se produce la interacción entre la placa neural y el ectodermo. En cualquier caso, los BMPs no bastan para inducir por sí solos la cresta neural. Por si fuera poco, BMP4 y BMP7, los candidatos propuestos, tienen un patrón de expresión que casa mal con un papel inductor, ya que se expresan más en los bordes de la placa neural que en el ectodermo, es decir, más en el receptor de la hipotética señal que en el emisor.

Un trabajo recientemente publicado podría haber resuelto la cuestión acerca de la señal que el ectodermo produce para la inducción de la cresta neural en embriones de pollo [García-Castro et al., *Science* **297**:848-851 (2002)]. El grupo de Marianne Bronner-Fraser en el Caltech de Pasadena comenzó por buscar proteínas de la familia Wnt (se conocen 19 en humanos) que se expresaran en el ectodermo adyacente a la placa neural y en el momento de la diferenciación de la cresta neural. Entre los candidatos ensayados Wnt6 mostró el patrón de expresión más adecuado. A partir de esta evidencia, los experimentos mostraron, uno tras otro, la implicación de Wnt6 y, en general, de la vía de señalización por Wnt, en la inducción de la cresta neural. Por ejemplo cuando se inyectaron en la placa neural o en el tubo en formación células modificadas genéticamente para expresar un Wnt1 dominante negativo (una forma alterada de Wnt1 que bloquea la vía de señalización uniéndose a los receptores, correceptores o a los propios Wnts), se inhibió la expresión de Slug y HNK-1, marcadores de la cresta neural. Cuando se cultivaron explantes aislados de placa neural con BMP no se produjo, como es lógico, la expresión de marcadores de cresta neural ni la migración de células del explante, a menos que el medio estuviera enriquecido con factores de crecimiento. Sin embargo, cuando el medio de cultivo estaba condicionado por células S₂ de *Drosophila*, transfectadas para secretar *Wingless* (el homólogo de *Wnt-1* en la mosca del vinagre), el explante produjo células migradoras que expresaban marcadores de cresta neural. Esto sucedió incluso cuando se utilizaban medios mínimos de cultivo. Este resultado es muy significativo, ya que el medio condicionado por células S₂ de *Drosophila*

dispara el mecanismo de señalización por Wnts en varios sistemas de células de vertebrados. Los experimentos de control, en fin, mostraron que es la activación de este sistema la señal necesaria y suficiente para poner en marcha la diferenciación de la cresta neural.

Recordemos que la vía canónica de señalización por Wnts implica la activación de receptores Frizzled, la estabilización de la β -catenina citoplasmática cuya degradación es inhibida, su traslocación al núcleo y su unión a cofactores TCF/LEF para actuar como factor de transcripción. De hecho, β -catenina se localiza en el núcleo de las células de la placa neural inducidas para formar cresta neural y se sabe además que, en *Xenopus*, la sobreexpresión de β -catenina produce un exceso de formación de

cresta neural.

En resumen, la importantísima vía de señalización por Wnts, en concreto la mediada por Wnt6, parece ser clave en la inducción de la cresta neural, uno de los procesos fundamentales del desarrollo de vertebrados. Esto se añade a una larga lista de procesos de desarrollo regulados por Wnts, que van desde la polaridad de segmentos en *Drosophila* al establecimiento de patrones dorsoventrales en vertebrados pasando por la formación del patrón anteroposterior del tubo nervioso. Resulta realmente fascinante que un mismo sistema de señales sea reclutado por procesos tan distantes entre sí, en una nueva muestra de «economía de la naturaleza».